Труды Зоологического института РАН
Том 320, № 2, 2016, с. 176–192

УДК 595.123:591.81:576.31

УЛЬТРАСТРУКТУРА НЕОБЛАСТОВ У ТУРБЕЛЛЯРИИ *GEOCENTROPHORA WAGINI* TIMOSHKIN, 1984 (LECITHOEPITHELIATA: PLATHELMINTHES)

И.М. Дробышева

Зоологический институт Российской академии наук, Университетская наб. 1, 199034 Санкт-Петербург, Россия; e-mail: irina.droby@gmail.com

РЕЗЮМЕ

Ацеломорфа и плоские черви (Acoelomorpha и Plathelminthes) обладают уникальной системой стволовых клеток – необластов, которые, как полагают, составляют единый пролиферативный компартмент для соматических клеток и клеток зародышевой линии. Между тем на электронно-микроскопическом уровне эти клетки остаются не изученными в большинстве таксонов ресничных червей. В этой работе описывается ультраструктура необластов у турбеллярии из таксона Lecithoepitheliata (Plathelminthes): байкальского эндемика *Geocentrophora wagini* Timoshkin, 1984. Необластоподобные клетки *G. wagini* определяются высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением. Цитоплазма обнаруживает черты недифференцированных клеток: она содержит свободные рибосомы и митохондрии, тогда как другие органеллы редки и встречаются не во всех необластах. На основании цитоплазматической и ядерной организации в паренхиме выделены три основных типа необластов. В типе 1 ядра имеют сложную, разветвленно-отростчатую конфигурацию. Периферический гетерохроматин не выражен. В цитоплазме встречается крупная рыхлая структура фиброзной природы, а также миниатюрный аппарат Гольджи с несколькими секреторными гранулами. Ядра необластов типа 2, несмотря на отдельные выросты или инвагинации, имеют более простые и обычные контуры, чем таковые типа 1. Наблюдается слабое развитие периферического конденсированного хроматина, а плотность распределения отдельных сгустков гетерохроматина по всему пространству ядра обычно выше по сравнению с типом 1. Вблизи оболочки ядра со стороны цитоплазмы иногда можно видеть кластер мелких плотных гранул или небольшое рыхлое тельце. Для необластов типа 3 характерны наиболее компактные ядра с гетерохроматином в виде крупных неправильных блоков предельно высокой электронной плотности. Многие из этих блоков соединяются друг с другом и с мембраной ядра. Скудная цитоплазма содержит только митохондрии и рибосомы. Недифференцированные клетки в гастродермисе демонстрируют сходство с необластами типа 2 в паренхиме. Впервые за пределами Tricladida в цитоплазме необластов отмечены особые структуры: рыхлые фиброзные тельца и кластеры гранул, которые, вероятно, могут быть функционально тождественны хроматоидным тельцам планарий. Полученные результаты вносят свой вклад в сравнительную морфологию стволовых клеток у плоских червей и базовых Bilateria и подтверждают гетерогенность пролиферативного компартмента у турбеллярий.

Ключевые слова: Lecithoepitheliata, Plathelminthes, стволовые клетки

ULTRASTRUCTURE OF NEOBLASTS IN TURBELLARIAN *GEOCENTROPHORA WAGINI* TIMOSHKIN, 1984 (LECITHOEPITHELIATA: PLATHELMINTHES)

I.M. Drobysheva

Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences, Universitetskaya Emb. 1, 199034 Saint Petersburg, Russia; e-mail: irina.droby@gmail.com

ABSTRACT

Acoelomorpha and Plathelminthes have a unique system of stem cells (neoblasts), which is believed to represent a common proliferative compartment of somatic and germ line cells. Meanwhile, on the electron-microscopic level, these cells are not studied in most taxa of Turbellaria. In this study, I describe the ultrastructure of neoblasts in

Geocentrophora wagini Timoshkin, 1984 (Lecithoepitheliata, Plathelminthes), an endemic turbellarian from Lake Baikal. The neoblast-like cells showed a high nucleus/cytoplasm ratio. The cytoplasm revealed the features of undifferentiated cells. Particularly, there were free ribosomes and mitochondria, while other organelles were rare and did not occur in all the cells studied. Based on their cytoplasmic and nuclear organization, three main types of parenchymal neoblasts have been distinguished. In type 1, the nuclei had a complex, highly branched configuration. The peripheral heterochromatin was not developed. A large loose structure of fibrous nature and a tiny Golgi apparatus with several secretory granules could be observed in the type 1 neoblast cytoplasm. The nuclei of the type 2 neoblasts had much simpler outlines than those of type 1, despite some processes or invaginations. The poor development of peripheral condensed chromatin was observed and distribution density of the heterochromatin clumps tended to be slightly higher, as compared to type 1. A cluster of small dense granules or a little loose body occasionally could be seen in the proximity to nuclear membrane. Type 3 neoblasts had the most compact nuclei and their heterochromatin was seen as large, irregular clumps of extremely high electron density. Many of these clumps were connected with each other and with the nuclear membrane. The scarce cytoplasm contained only mitochondria and ribosomes. Undifferentiated cells in the gastrodermis were similar to the type 2 neoblasts in the parenchyma. For the first time outside Tricladida special structures were found in the neoblast cytoplasm. These loose fibrous bodies and clusters of granules are likely to be functionally identical to the planarian chromatoid bodies. The obtained results contribute to the comparative morphology of the stem cells in flatworms and basic Bilateria and confirm the heterogeneity of the proliferative compartment in Turbellaria.

Key words: Lecithoepitheliata, Plathelminthes, stem sells

ВВЕДЕНИЕ

Стволовые клетки у турбеллярий (Acoelomorpha, Plathelminthes), обычно называемые необластами, известны как единственный источник умножения и возобновления клеток во время роста, физиологической регенерации и восстановления утраченных частей тела (Gustafsson 1977; Ehlers 1985; Rieger et al. 1991; Hori 1997; Baguñà 1998, 2012; Rieger et al. 1999; Gschwentner et al. 2001; Peter et al. 2004; Egger et al. 2009).

Согласно сравнительно недавним поразительным исследованиям, трансплантация единственного необласта в летально облученных планарий *Schmidtea mediterranea* восстанавливает нормальный тканевой гомеостаз и возрождает способность животных к регенерации (Wagner et al. 2011). При этом клоногенные необласты производят клетки, которые дифференцируются в нейрональные, кишечные и другие известные типы постмитотических клеток и распределяются по всему телу животного, что свидетельствует о плюрипотентности соматических стволовых клеток и их способности к самовозобновлению (Wagner et al. 2011; Wagner et al. 2012). Такой единый (унифицированный) тип стволовой клетки для всех тканей и их систем представляет, скорее, экстраординарную ситуацию среди Bilateria (Rieger et al. 1999; Ladurner et al. 2000; Peter et al. 2004; Rossi et al. 2007; Egger et al. 2009), поскольку у всех хорошо изученных высших многоклеточных подобные клетки редко являются единственным источником клеточного возобновления во взрослой жизни (Rieger et al. 1999; Weissman 2000; Гривенников [Grivennikov] 2008; Dimmeler and Losordo 2011).

Излюбленным модельным объектом при изучении необластов у турбеллярий были (и все еще остаются) планарии (Tricladida, Plathelminthes), что в значительной степени обусловлено их необычайными регенеративными способностями и относительной легкостью культивирования в лабораторных условиях (Baguñà et al. 1989; Agata and Watanabe 1999; Reddien and Sánchez Alvarado 2004; Saló 2006; Sánchez Alvarado 2006; Newmark et al. 2008; González-Estévez et al. 2012; Saló et al. 2009; Aboobaker 2011; Gentile et al. 2011; Tasaki et al. 2011; Baguñà 2012). Для оценки геномной специфичности соматических стволовых клеток у турбеллярий, главным образом у планарий, в последнее десятилетие широко используются разнообразные достижения молекулярной техники (Rossi et al. 2007; Pfister et al. 2008; Robb et al. 2008; Eisenhoffer et al. 2008; De Mulder et al. 2009; Fernández-Taboada et al. 2011; Moritz et al. 2012; Nakagawa et al. 2012; Solana et al. 2012; Elliott and Sánchez Alvarado 2013; Reddien 2013; Rink 2013; Rouhana et al. 2013; Sasidharan et al. 2013; Almuedo-Castillo et al. 2014; Robb and Sánchez Alvarado 2014;

Scimone et al. 2014; Vásquez-Doorman and Petersen 2014). Исключительная концентрация внимания на молекулярных признаках необластов отодвинула в тень классические ультраструктурные исследования. Между тем о тонкой морфологии стволовых клеток у представителей большинства таксонов внутри Acoelomorpha и Plathelminthes практически ничего не известно, и принято априори считать, что ранние стволовые клетки всех турбеллярий должны соответствовать необластам планарий, у которых эти клетки первыми среди Plathelminthes были подробно изучены на электронно-микроскопическом уровне (Pedersen 1959; Morita et al. 1969; Coward 1974; Hay and Coward 1975) и до сих пор рассматриваются в качестве классического эталона стволовой клетки ресничных червей.

Характерные признаки необласта планарий – высокий показатель отношения ядра к цитоплазме и недостаток цитоплазматических органелл, за исключением митохондрий и рибосом. При этом ядро имеет крупное ядрышко и отличается равномерным распределением мелких, изолированных сгустков гетерохроматина при фактическом отсутствии пристеночного конденсированного хроматина (Morita et al. 1969; Coward 1974; Hay and Coward 1975). Особенностью необласта планарий являются хроматоидные тельца – округлые, не окруженные мембраной электронно-плотные образования вблизи ядра со стороны цитоплазмы (Morita et al. 1969; Coward 1974; Hori 1982). Необласты с начальными признаками специализации (что выражается в появлении новых органелл в цитоплазме и уменьшением числа хроматоидных телец) относят к категории дифференцирующихся стволовых клеток, также называемых регенеративными клетками при восстановлении утраченных частей тела (Hori 1992, 1997; Higuchi et al. 2007).

Кроме планарий (Tricladida, Plathelminthes), ультраструктура необластов исследована у нескольких микротурбеллярий из Catenulida (Plathelminthes), Macrostomida (Plathelminthes) и Acoela (Xenacoelomorpha).

У микростомид (Microstomidae, Macrostomida, Plathelminthes) и катенулид (Catenulida, Plathelminthes) обнаружены два типа необластов, различающихся по наличию или отсутствию кластера варьирующего числа центриолей (Moraczewski 1977; Palmberg 1990, 1991). В этих стволовых клетках ультраструктура ядра не описывалась детально, а в цитоплазме необластов катенулид, помимо рибосом и митохондрий, отмечались цистерны ШЕР (шероховатого эндоплазматического ретикулума) и, изредка, аппарата Гольджи (Moraczewski 1977).

В соответствии со структурой ядерного гетерохроматина и сопутствующими цитоплазматическими признаками, у макростомид (Macrostomidae, Macrostomida, Plathelminthes) выделены три формы необластов (Rieger et al. 1999; Bode et al. 2006), а у бескишечных турбеллярий (Acoela, Acoelomorpha) – только две, совпадающие с 1-й и 3-й формами необластов макростомид (Gschwentner et al. 2001). Необласты 1-й категории похожи на «классические» необласты планарий: крупное ядро с мелкими, изолированными блоками гетерохроматина имеет ядрышко, скудная цитоплазма содержит только митохондрии и рибосомы. В ядрах необластов 3-й категории гетерохроматин формирует более рельефные пучки, соединенные друг с другом и с хорошо развитой ядерной ламиной, а в цитоплазме присутствуют ШЕР и комплекс Гольджи (Rieger et al. 1999; Gschwentner et al. 2001). В категорию 2 попадают необласты с промежуточными признаками ядерного гетерохроматина, без дополнительных цитоплазматических органелл (Rieger et al. 1999). Эти выделенные формы чаще рассматриваются как стадии развития однородных стволовых клеток в ходе их клеточной специфики (Rieger et al. 1999; Маркосова и Мамкаев [Markosova and Mamkaev] 2000; Gschwentner et al. 2001), хотя одновременно высказывается предположение, что разные категории необластов могут представлять собой разные субпопуляции, каждая из которых характеризуется особым клеточным циклом (Bode et al. 2006; Peter et al. 2004).

В отличие от планарий, в необластах и регенеративных клетках исследованных микротурбеллярий структуры, которые могли бы классифицироваться как явные хроматоидные тельца, не были найдены (Moraczewski 1977; Palmberg 1986; Hori et al. 1999; Rieger et al. 1999; Маркосова и Мамкаев [Markosova and Mamkaev] 2000; Gschwentner et al. 2001; Bode et al. 2006). Наряду с отмеченными свойствами ядра и цитоплазмы, общими внешними признаками стволовых клеток всех изученных представителей Acoelomorpha и Plathelminthes принято считать мелкие размеры (3–12 мкм в диаметре) и сферическую или вере-

теновидную форму тела (Rieger et al. 1999; Shibata et al. 2010; Baguñà 2012).

Сведения о стволовых клетках у турбеллярий таксона Lecithoepitheliata (Plathelminthes) в литературе отсутствуют, не считая тезисов автора (Дробышева [Drobysheva] 2012, 2014).

В данной работе впервые представлено описание ультраструктуры необластов у лецитоэпителиаты *Geocentrophora wagini* Timoshkin, 1984 (Lecithoepitheliata, Plathelminthes). При этом показано, что необласты *G. wagini* при сходстве базовых признаков со стволовыми клетками других турбеллярий представляют собой гетерогенную по морфологическим признакам популяцию и могут отличаться от стволовых клеток других турбеллярий состоянием гетерохроматина и особыми структурами в цитоплазме.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили взрослые особи байкальской эндемичной турбеллярии *Geocentrophora wagini* (Lecithoepitheliata, Plathelminthes). Собранные экземпляры фиксировали целиком в 2%-ном растворе глутаральдегида на 0.05М какодилатном буфере (pH=7.2) в течение 2 часов при 4 °С и дофиксировали в 2%-ном растворе четырехокиси осмия (Московский химзавод им. Войкова) на том же буфере в течение 2 часов при комнатной температуре, затем обезвоживали в серии растворов этанола возрастающей концентрации и в ацетоне, после чего заключали в смесь Эпон-Аралдит (Fluka Chemie AG-9470 Buchs, Switzerland). Ультратонкие срезы, полученные на ультратомах LKB III и Leica EM UC6rt, контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и просматривали в электронных микроскопах LEO 900, JEM 1200-EX или Morgagni при ускоряющем напряжении 80 кВ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

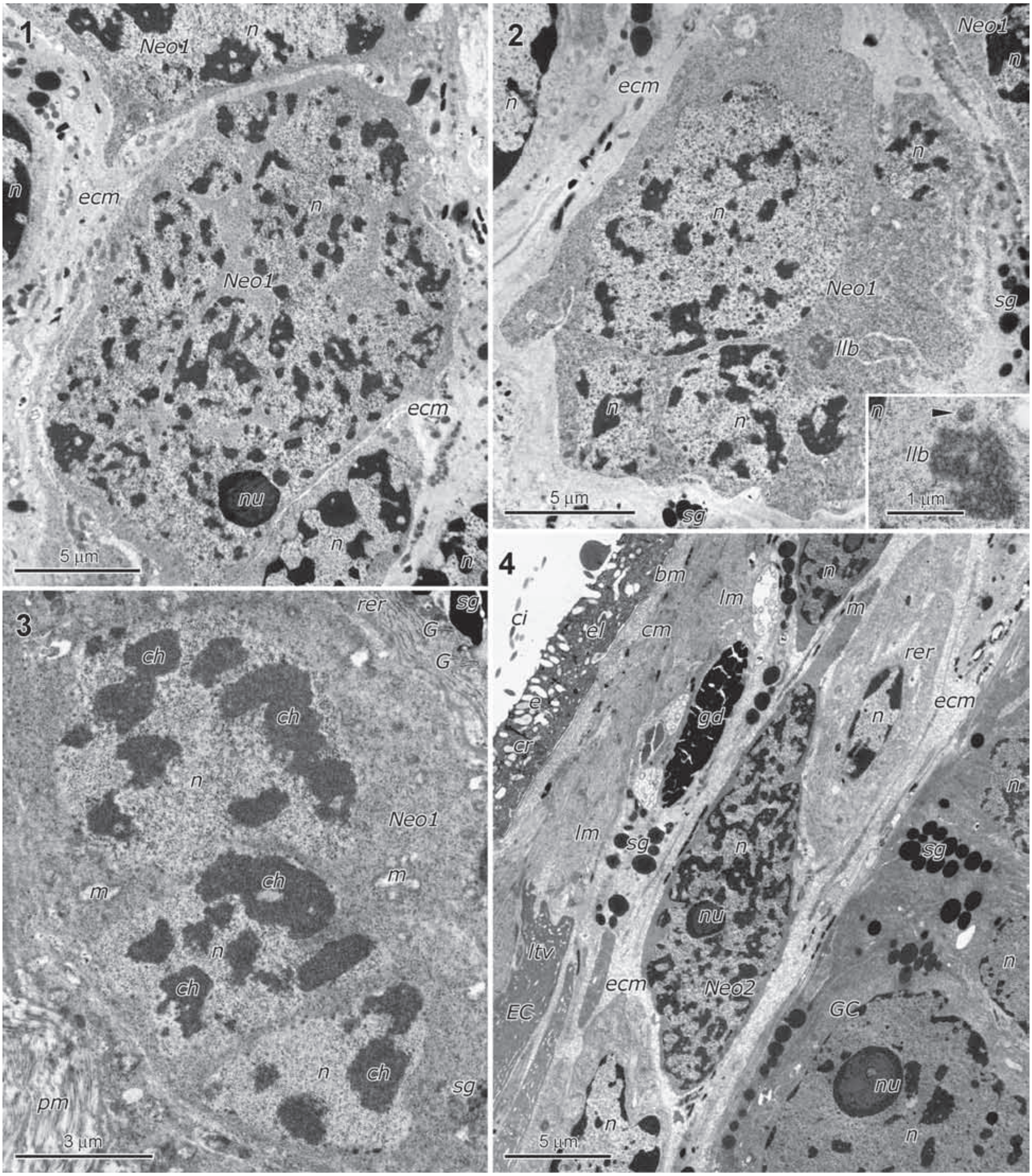
Необласты *G. wagini* характеризуются высоким ядерно-цитоплазматическим отношением и скудостью цитоплазматических органелл (Рис. 1–10). Цитоплазма заполнена свободными рибосомами, среди них неравномерно разбросаны митохондрии, изредка наблюдаются мелкие фагосомы. В некоторых необластах обнаружен миниатюрный аппарат Гольджи с небольшим числом плотных секреторных гранул (Рис. 11С), а также особые структуры – рыхлые тельца и кластеры фиброзных гранул (Рис. 11).

Ядро содержит крупное округлое ядрышко, неоднородное по своей электронной плотности (Рис. 1, 4, 7, 8). В редких случаях имеются два ядрышка. Наружный, варьирующей толщины (вплоть до исчезновения) слой ядрышка более плотный по сравнению с сердцевиной, инкрустированной точечными вкраплениями высокой плотности (Рис. 1, 4, 7, 8). Периферическая часть ядрышка, очевидно, соответствует плотному фибриллярному компоненту (ПФК), тогда как срединная зона представляет собой фибриллярный центр (ФЦ); гранулярный компонент ядрышка не был выражен.

У подавляющего большинства необластов электронная плотность ядерного гетерохроматина значительно ниже, чем в ядрах дифференцированных соматических клеток (Рис. 6), а ядерная ламина обычно не просматривается и, возможно, отсутствует на больших площадях. При этом перинуклеарное пространство более узкое по сравнению с ядрами дифференцированных соматических клеток: у необласта оно составляет в среднем 21 нм, тогда как у дифференцированных клеток эта величина приближается к 69 нм. В оболочке ядра могут быть видны поры с тонкодисперсным материалом, который выделяется в цитоплазму околоядерного пространства и формирует мелкие, похожие на облачка структуры средней электронной плотности. Отвечая главным ультраструктурным критериям стволовой клетки, необласты в паренхиме *G. wagini* в то же время демонстрируют замечательное морфологическое разнообразие, в пределах которого можно условно выделить три основные категории клеток.

Необласты в паренхиме

Необласты 1-го типа. Контуры этих клеток близки к округлым (Рис. 1, 2), цитоплазма иногда образует лопасти, похожие на псевдоподии (Рис. 2). Ядро очень сложной конфигурации с нерегулярными червеобразными выростами дает на отдельных срезах картину нескольких, разной величины ядер в одной клетке (Рис. 2). Гетерохроматин в ядрах некоторых необластов представлен преимущественно мелкими и относительно однородными сгустками (Рис. 1), в ядрах других


1
Neo1
n
n
ecm
n
Neo1
ecm
nu
n
n
5 µm
2
Neo1
n
ecm
n
n
n
Neo1
sg
llb
n
n
n
llb
5 µm
sg
1 µm
3
rer
sg
G
G
ch
ch
n
Neo1
m
m
ch
n
ch
n
ch
sg
pm
3 µm
4
bm
n
ci
lm
el
cm
m
rer
e
gd
n
ecm
cr
n
lm
sg
n
sg
nu
ltv
n
ecm
Neo2
EC
GC
nu
n
n
5 µm

эти структуры сильно варьируют в размерах и могут достигать значительной величины (Рис. 1, фрагмент необласта вверху). Отдельные срезы крупных гетерохроматиновых сгустков нередко выглядят электронно-плотными, неправильных очертаний пластинками, пронизанными отверстиями разного диаметра (Рис. 1). Периферический гетерохроматин не развит, обуславливаясь (от случая к случаю) сцеплениями с внутренней мембраной ядра разобщенных, главным образом крупных, гетерохроматиновых блоков, распределенных по ядру неравномерно (Рис. 1, 2).

В цитоплазме необластов этого типа часто присутствует группа плотных варьирующей величины гранул секрета вблизи миниатюрного аппарата Гольджи (Рис. 3, 11С), а также необычное рыхлое тельце фиброзной природы (Рис. 2, 11А–С). Форма рыхлых телец изменчива – от неправильной с выступами, до округлой. На срезе крупное рыхлое тельце имеет бреши разных размеров и

Рис. 1. *Geocentrophora wagini*. Необласт первого типа. Ядро сложной конфигурации с нерегулярными червеобразными выростами, имеется одно ядрышко. Сгустки гетерохроматина относительно равномерно разбросаны по ядру, пристеночный конденсированный хроматин не развит. Другой необласт типа 1 виден в верхней части изображения. *Сокращения: ect* – экстрацеллюлярный матрикс, *n* – ядро, *Neo1* – необласт первого типа, *nu* – ядрышко.

Fig 1. *Geocentrophora wagini*. The type 1 neoblast. The nucleus of the complex configuration with irregular vermiform appendages, there is one nucleolus. Clumps of heterochromatin are relatively evenly scattered throughout the nucleus; peripheral condensed chromatin is not developed. Another neoblast of type 1 is visible at the top of the picture. *Abbreviations: ect* – extracellular matrix, *n* – nucleus, *Neo1* – type 1 neoblast, *nu* – nucleolus.

Рис. 2. *Geocentrophora wagini*. Необласт первого типа. Картина нескольких разноразмерных ядер в одной клетке обусловлена разветвлённой формой ядра. Недалеко от ядерной оболочки – крупное рыхлое тельце со «спутником». В правом верхнем углу – фрагмент необласта типа 1; в левом верхнем углу – фрагмент соматической паренхимной клетки. Вставка: рыхлое тельце со «спутником» при большем увеличении. *Сокращения: ect* – экстрацеллюлярный матрикс, *llb* – крупное рыхлое тельце, *n* – ядро, *Neo1* – необласт первого типа, *nu* – ядрышко, *sg* – секреторные гранулы; голова стрелки отмечает «спутник» крупного рыхлого тельца.

Fig. 2. *Geocentrophora wagini*. The type 1 neoblast. Branched nucleus looks like several nuclei of different sizes on the single section. Large loose body and its satellite are located not far from the nucleus envelope. Fragment of the type 1 neoblast is visible in the upper right corner; fragment of the somatic parenchymal cell is seen in the upper left corner. Insert: a large loose body and its "satellite" at higher magnification. *Abbreviations: ect* – extracellular matrix, *llb* – large loose body, *n* – nucleus, *Neo1* – type 1 neoblast, *nu* – nucleolus, *sg* – secretory granules; arrowhead marks "satellite" of large loose body.

Рис. 3. *Geocentrophora wagini*. Необласт первого типа в профазе митоза. Хромосомы конденсируются в ядре, сохраняющем сложную конфигурацию; ядерная оболочка во многих местах хорошо различима. Внизу справа в цитоплазме видны мелкие секреторные гранулы аппарата Гольджи. Вверху справа – фрагмент цитоплазмы секреторной клетки в паренхиме. *Сокращения: ch* – конденсированный хроматин, *G* – аппарат Гольджи, *m* – митохондрия, *n* – ядро, *Neo-1* – необласт первого типа, *nu* – ядрышко, *pm* – паренхимные мышцы, *rer* – профили шероховатого эндоплазматического ретикулума, *sg* – секреторные гранулы.

Fig. 3. *Geocentrophora wagini*. The type 1 neoblast in the prophase of mitosis. Condensed chromosomes are located inside the nucleus that retains a complex configuration; nuclear envelope is discernible in many places. Small secretory granules of Golgi apparatus are visible in the cytoplasm at the bottom right. Top right: minor part of the cytoplasm of parenchymal secretory cell. *Abbreviations: ch* – condensed chromosomes, *G* – Golgi apparatus, *m* – mitochondrion, *n* – nucleus, *Neo-1* – type 1 neoblast, *nu* – nucleolus, *pm* – parenchymal muscles, *rer* – profiles of rough endoplasmic reticulum, *sg* – secretory granules.

Рис. 4. *Geocentrophora wagini*. Необласт второго типа с удлиненно-веретеновидным профилем. Сгустки и пряди гетерохроматина разбросаны по всему пространству ядра с ядрышком, имеются участки конденсированного пристеночного хроматина. Внизу слева – фрагмент погруженной части эпидермальной клетки (цитона), справа – гастродермис. *Сокращения: bm* – базальная мембрана, *ci* – реснички, *cm* – кольцевые мышцы, *cr* – ресничный корешок, *e* – эпителиосома, *EC* – эпидермальная клетка (цитон), *ecm* – экстрацеллюлярный матрикс, *el* – эпителиальный слой, *G* – аппарат Гольджи, *GC* – гастродермальная клетка, *gd* – проток паренхимной железы, *lm* – продольные мышцы, *ltv* – светлые трубочки и пузырьки, *m* – митохондрия, *n* – ядро, *Neo2* – необласт второго типа, *nu* – ядрышко, *pm* – паренхимные мышцы, *rer* – профили шероховатого эндоплазматического ретикулума, *sg* – секреторные гранулы.

Fig. 4. *Geocentrophora wagini*. The type 2 neoblast with an elongated spindle-shaped profile. Clumps and strands of heterochromatin are scattered throughout the space of nucleus with nucleolus. There are peripheral areas of condensed chromatin. Bottom left: fragment of the insunk part of epidermal cell (cyton); right: gastrodermis. *Abbreviations: bm* – basement membrane, *ci* – cilia, *cm* – circular muscles, *cr* – ciliary rootlet, *e* – epitheliosome, *EC* – epidermal cell (cyton), *ecm* – extracellular matrix, *el* – epithelial layer, *G* – Golgi apparatus, *GC* – gastrodermal cell, *gd* – parenchymal gland duct, *lm* – longitudinal muscles, *ltv* – light tubules and vesicles, *m* – mitochondrion, *n* – nucleus, *Neo-2* – type 2 neoblast, *nu* – nucleolus, *pm* – parenchymal muscles, *rer* – profiles of rough endoplasmic reticulum, *sg* – secretory granules.

очертаний; иногда рядом с ним находится (в виде «спутника») мелкое рыхлое тельце (Рис. 2, 11В). В цитоплазме у одного необласта, кроме стопки коротких цистерн аппарата Гольджи и структуры, напоминающей рыхлое тельце, на другой стороне клетки вблизи оболочки ядра обнаружен кластер мелких, сильно разрозненных фиброзных гранул (Рис. 11D). В отдельных участках необластов этого типа цитоплазматическое пространство между ядром и границей клетки заметно расширено, что, вероятно, может быть следствием как необычной формы ядра, так и, скорее, началом процесса дифференцировки, приводящей к увеличению цитоплазматической массы.

Для необластов 1-го типа характерно формирование небольших тесных скоплений, обычно расположенных ближе к кишечнику, чем к кожно-мышечному мешку. Среди клеток одного из таких скоплений обнаружена клетка в профазе митоза с ядром, контуры которого демонстрируют типичную для необластов этого типа сложную конфигурацию (Рис. 3). Диаметр необластов 1-го типа в среднем составляет 17 мкм.

Необласты 2-го типа. Необласты этого типа чаще всего разбросаны поодиночке и парами по всей паренхиме, не проявляя явной тенденции к образованию относительно обособленных групп. Очертания необластов изменяются в широких пределах: от удлиненных веретеновидных до угловатых и неправильной формы (Рис. 4, 5). Их ядра, несмотря на отдельные лопасти или глубокие инвагинации ядерной оболочки, имеют в целом более простое и обычное, не разветвленное, тело по сравнению с ядрами необластов 1-го типа. Гетерохроматиновые сгустки чаще соединяются друг с другом и с мембраной ядра, а их плотность распределения, как правило, выше, чем в ядрах необластов 1-го типа. Характер ядерного гетерохроматина в необластах 2-го типа в какой-то мере изменчив: гетерохроматиновые сгустки и пряди могут быть более массивными и рельефными в одних клетках и менее выраженными в других, но большинство необластов этого типа демонстрирует смешанный состав и мелких, и крупных сгустков (Рис. 4–6). Из органелл в цитоплазме регулярно присутствуют митохондрии и рибосомы. В нескольких клетках недалеко от ядра найдено рыхлое тельце небольшого размера, составленное из близко лежащих крупных фиброзных гранул (Рис. 11Е, F). У единичных необластов этого типа рядом с ядром наблюдалось скопление мелких плотных фиброзных гранул (Рис. 6, вставка). При наличии отмеченных органелл объем цитоплазмы, как казалось, был увеличенным. Тем не менее, в соответствии с морфологией ядра и характеристикой гетерохроматина, а также учитывая скудное содержимое цитоплазмы (в частности, отсутствие заметного комплекса Гольджи с секреторными гранулами), эти необласты с особыми органеллами отнесены к типу 2. Размеры необластов этого типа более вариабельны, чем у 1-го типа, а их средний диаметр приближается к 16 мкм.

Необласты 3-го типа. Эти стволовые клетки имеют наиболее компактные ядра, чьи контуры достаточно редко демонстрируют единичные выступы или глубокие инвагинации (Рис. 7, 8). Предельно высокой электронной плотности (как в ядрах специализированных клеток) гетерохроматин в виде очень крупных, перфорированных сгустков и прядей заполняет все ядерное пространство (Рис. 7, 8). Гетерохроматиновые структуры могут соединяться между собой и с оболочкой ядра, что приводит к причудливым картинам на срезе (Рис. 8). Крайне скудная цитоплазма, тонким слоем окаймляющая ядро, содержит только рибосомы и митохондрии. Структуры, подобные кластерам разрозненных гранул или рыхлым тельцам, в клетках этого типа не были найдены. В паренхиме необласты 3-го типа обычно встречаются реже необластов типа 2, но так же, как и последние, повсеместно, и иногда они образуют пары друг с другом (Рис. 8) или находятся по соседству с необластами 2-го типа. По своим размерам необласты 3-го типа самые мелкие: их диаметр составляет около 10–11 мкм.

Среди клеток паренхимы и экстрацеллюлярного матрикса обнаружены два одиночных необласта с признаками митотической активности. У одного необласта спирализованные хромосомы располагаются в цитоплазме, оболочка ядра отсутствует (Рис. 9). Другой необласт имеет вид, характерный для клетки после недавно произошедшей цитотомии, если судить по состоянию общей массы гетерохроматина под ядерной оболочкой и малому размеру самой клетки (Рис. 10). Поскольку отмеченные необласты окружены соматическими специализированными клетками и их отростками, а на серии срезов в цитоплазме у них нет иных органелл, кроме митохондрий и рибосом, их можно было бы отнести как к типу 2, так и 3.

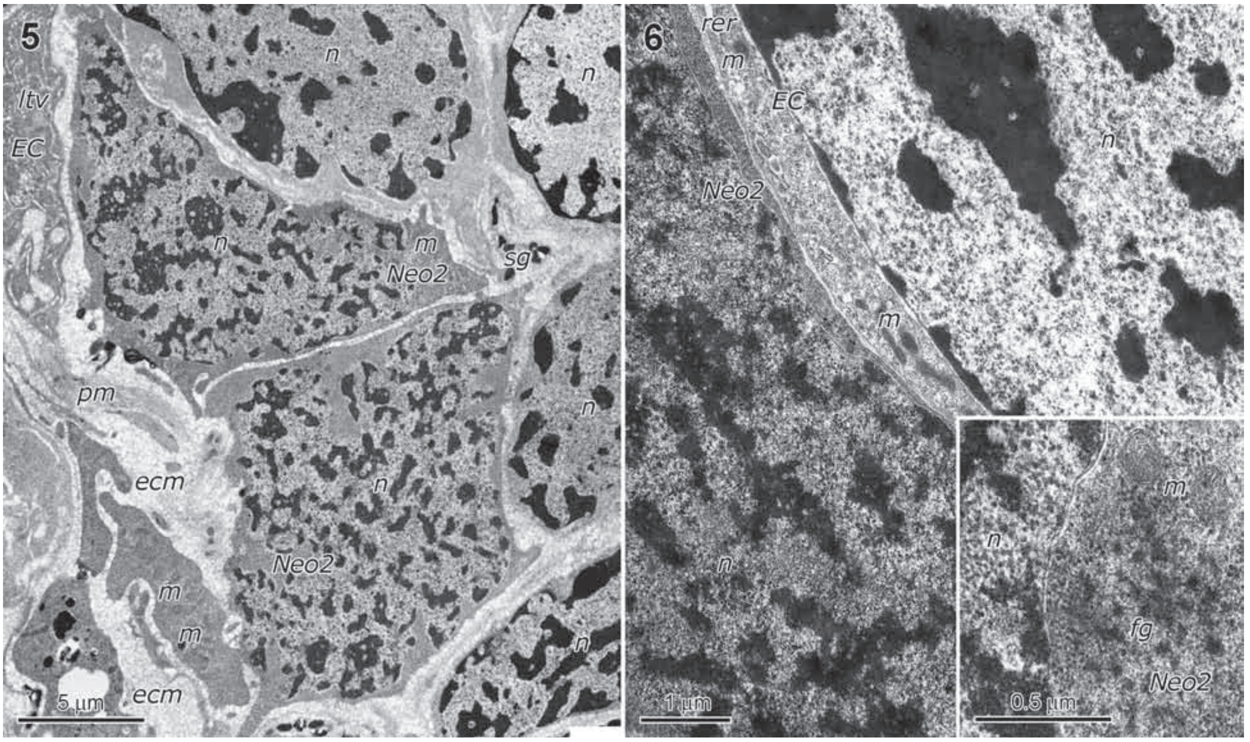


Рис. 5. *Geocentrophora wagini*. Два необласта второго типа с угловатыми контурами в окружении паренхимных клеток, их отростков и экстрацеллюлярного матрикса. Ядро нижнего необласта имеет глубокие инвагинации ядерной оболочки. Слева вверху – фрагмент цитоплазмы цитона. *Сокращения: EC* – эпидермальная клетка (цитон), *ecm* – экстрацеллюлярный матрикс, *gd* – проток паренхимной железы, *ltv* – светлые трубочки и пузырьки, *m* – митохондрия, *n* – ядро, *Neo2* – необласт второго типа, *nu* – ядрышко, *pm* – паренхимные мышцы, *sg* – секреторные гранулы.

Fig. 5. *Geocentrophora wagini*. Two neoblasts of the second type with angular contours surrounded by parenchymal cells, their processes and the extracellular matrix. The nucleus of the lower neoblast has deep invaginations of the nuclear envelope. Top left: part of the cyton cytoplasm. *Abbreviations: EC* – epidermal cell (cyton), *ecm* – extracellular matrix, *gd* – parenchymal gland duct, *ltv* – light tubules and vesicles, *m* – mitochondrion, *n* – nucleus, *Neo2* – type 2 neoblast, *nu* – nucleolus, *pm* – parenchymal muscles, *sg* – secretory granules.

Рис. 6. *Geocentrophora wagini*. Фрагменты расположенных по соседству друг с другом цитона и необласта второго типа. Вставка: другой фрагмент того же необласта с кластером мелких фиброзных гранул вблизи ядерной оболочки при большем увеличении. *Сокращения: EC* – эпидермальная клетка (цитон), *fg* – кластер мелких фиброзных гранул, *m* – митохондрия, *n* – ядро, *Neo2* – необласт второго типа, *rer* – профили шероховатого эндоплазматического ретикулума.

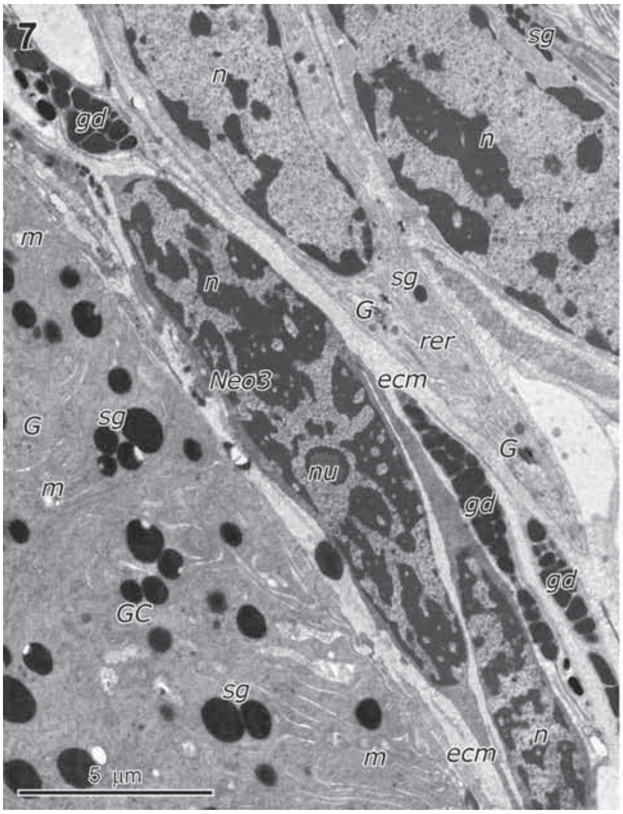
Fig. 6. *Geocentrophora wagini*. Fragments of a cyton and the type 2 neoblast very closely located. Insert: small portion of the same neoblast with a cluster of fibrous granules near the nuclear envelope at higher magnification. *Abbreviations: EC* – epidermal cell (cyton), *fg* – cluster of small fibrous granules, *m* – mitochondrion, *n* – nucleus, *Neo2* – type 2 neoblast, *rer* – profiles of rough endoplasmic reticulum.

Необласты в гастродермисе

При изучении серийных срезов под световым микроскопом, в гастродермисе *G. wagini*, в исключительно редких случаях, были отмечены клетки с митотическими фигурами. На электронно-микроскопическом уровне среди специализированных клеток кишки регулярно встречаются клетки с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением и бедной органеллами цитоплазмой. По форме ядра и состоянию гетерохроматина эти недифференцированные клетки более всего похожи на необласты 2-го типа в паренхиме.

ОБСУЖДЕНИЕ

Тонкая структура необластов *G. wagini* демонстрирует несомненное сходство со стволовыми клетками турбеллярий из других таксонов (Morita et al. 1969; Hay and Coward 1975; Hori 1982; Hori et al. 1999; Ehlers 1985; Rieger et al. 1991; Rieger et al. 1999; Gschwentner et al. 2001). Это ка-



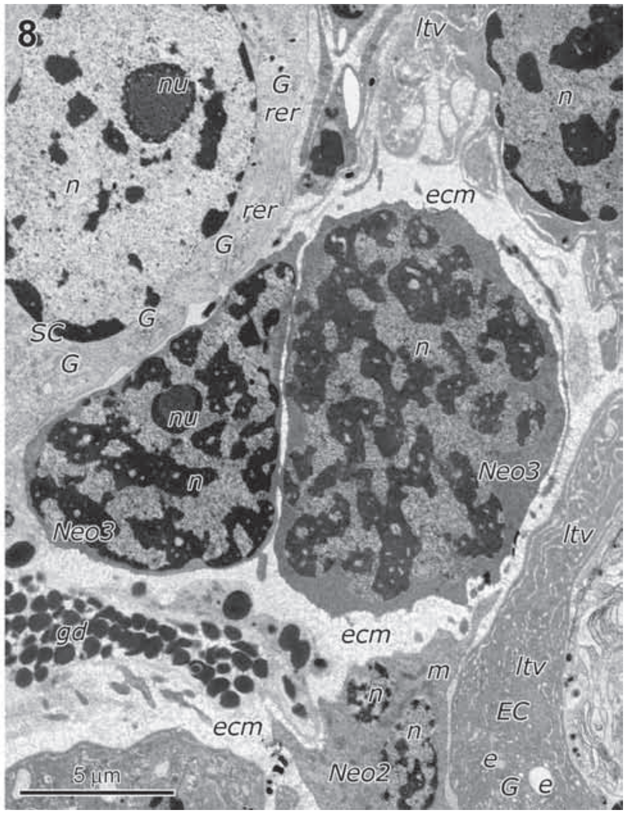


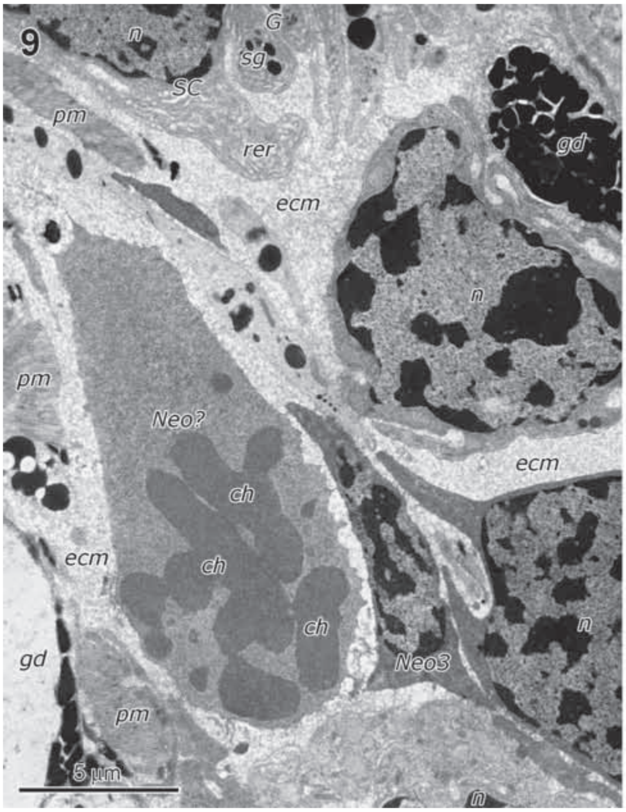
Рис. 7. *Geocentrophora wagini*. Необласт третьего типа, расположенный вдоль границы с гастродермисом. Крупные сгустки гетерохроматина высокой электронной плотности заполняют все пространство ядра. *Сокращения: ecm* – экстрацеллюлярный матрикс, *G* – аппарат Гольджи, *GC* – гастродермальная клетка, *gd* – проток паренхимной железы, *m* – митохондрия, *n* – ядро, *Neo3* – необласт третьего типа, *nu* – ядрышко, *rer* – профили шероховатого эндоплазматического ретикулума, *sg* – секреторные гранулы.

Fig. 7. *Geocentrophora wagini*. The type 3 neoblast located along the border with gastrodermis. Large clumps of heterochromatin of high electron density fill the entire space of the nucleus. *Abbreviations: ecm* – extracellular matrix, *G* – Golgi apparatus, *GC* – gastrodermal cell, *gd* – parenchymal gland duct, *m* – mitochondrion, *n* – nucleus, *Neo3* – type 3 neoblast, *nu* – nucleolus, *rer* – profiles of rough endoplasmic reticulum, *sg* – secretory granules.

Рис. 8. *Geocentrophora wagini*. Два необласта третьего типа среди паренхимных клеток, их отростков и экстрацеллюлярного матрикса. Внизу, в центре – фрагмент необласта, предположительно, второго типа; внизу, справа – фрагмент цитоплазмы цитона. *Сокращения: e* – эпителиосома, *EC* – эпидермальная клетка (цитон), *ecm* – экстрацеллюлярный матрикс, *G* – аппарат Гольджи, *gd* – проток паренхимной железы, *ltv* – светлые трубочки и пузырьки, *m* – митохондрия, *n* – ядро, *Neo2* – необласт второго типа, *Neo3* – необласт третьего типа, *nu* – ядрышко, *rer* – профили шероховатого эндоплазматического ретикулума, *SC* – секреторная клетка паренхимы, *sg* – секреторные гранулы.

Fig. 8. *Geocentrophora wagini*. Two neoblasts of the type 3 among parenchymal cells, their processes and the extracellular matrix. Below, in the center: fragment of a presumable type 2 neoblast. Bottom right: portion of the cyton cytoplasm. *Abbreviations: e* – epitheliosome, *EC* – epidermal cell (cyton), *ecm* – extracellular matrix, *G* – Golgi apparatus, *gd* – parenchymal gland duct, *ltv* – light tubules and vesicles, *m* – mitochondrion, *n* – nucleus, *Neo2* – type 2 neoblast, *Neo3* – type 3 neoblast, *nu* – nucleolus, *rer* – profiles of rough endoplasmic reticulum, *SC* – parenchymal secretory cell, *sg* – secretory granules.

сается соотношения объемов ядра и цитоплазмы в пользу ядра, отсутствия или слабого развития периферического гетерохроматина и дефицита цитоплазматических органелл, представленных главным образом рибосомами и митохондриями. В то же время результаты проведенного исследования свидетельствуют об определенных морфологических различиях между необластами *G. wagini* и других представителей Acoelomorpha и Plathelminthes. Прежде всего, необласты *G. wagini* заметно крупнее: их средний диаметр составляет около 14 мкм и варьирует от 10 до 17 мкм. У



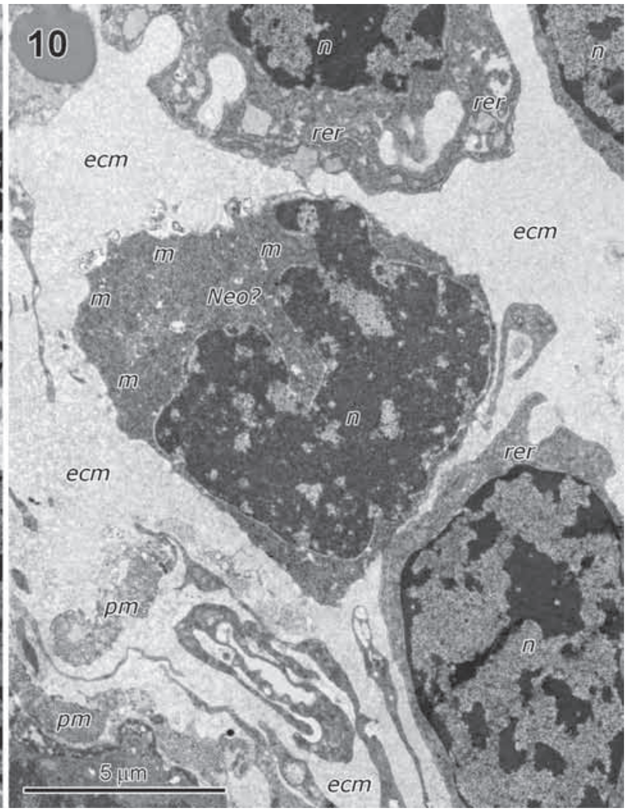


Рис. 9. *Geocentrophora wagini*. Необласт неопределенного типа в состоянии митоза. Оболочка ядра отсутствует, конденсированные хромосомы лежат в цитоплазме. *Сокращения: ecm* – экстрацеллюлярный матрикс, *G* – аппарат Гольджи, *gd* – проток паренхимной железы, *m* – митохондрия, *n* – ядро, *Neo?* – необласт неопределенного типа, *Neo3* – необласт третьего типа, *pm* – паренхимные мышцы, *rer* – профили шероховатого эндоплазматического ретикулума, *SC* – секреторная клетка паренхимы, *sg* – секреторные гранулы.

Fig. 9. *Geocentrophora wagini*. Neoblast of an indeterminate type in mitosis. The nucleus envelope is absent, condensed chromosomes are located in the cytoplasm. *Abbreviations: ecm* – extracellular matrix, *G* – Golgi apparatus, *gd* – parenchymal gland duct, *m* – mitochondrion, *n* – nucleus, *Neo?* – neoblast of indeterminate type, *Neo3* – type 3 neoblast, *pm* – parenchymal muscles, *rer* – profiles of rough endoplasmic reticulum, *SC* – parenchymal secretory cell, *sg* – secretory granules.

Рис. 10. *Geocentrophora wagini*. Необласт неопределенного типа после митотического деления среди экстрацеллюлярного матрикса и соматических клеток паренхимы. *Сокращения: ecm* – экстрацеллюлярный матрикс, *m* – митохондрия, *n* – ядро, *Neo?* – необласт неопределенного типа, *pm* – паренхимные мышцы, *rer* – профили шероховатого эндоплазматического ретикулума.

Fig. 10. *Geocentrophora wagini*. The indeterminate type neoblast after mitotic division among the extracellular matrix and somatic cells of the parenchyma. *Abbreviations: ecm* – extracellular matrix, *m* – mitochondrion, *n* – nucleus, *Neo?* – neoblast of indeterminate type, *pm* – parenchymal muscles, *rer* – profiles of rough endoplasmic reticulum.

планарий и микротурбеллярий этот параметр колеблется в зависимости от вида животного и типа необласта в пределах 3–12 мкм (Rieger et al. 1999; Shibata et al. 2010; Baguñà 2012; Reddien 2013). Литературные описания необластов дают картину округлых, веретеновидных или яйцеобразных клеток (Rieger et al. 1999; Shibata et al. 2010; Baguñà 2012), тогда как необласты *G. wagini* отличаются более широким спектром внешних контуров, что, возможно, объясняется значительным развитием экстрацеллюлярного матрикса в паренхиме и не статичным состоянием самих клеток (Дробышева [Drobysheva] 2007).

Сложная, разветвленно-отростчатая конфигурация ядер в необластах 1-го типа впервые отмечена среди стволовых клеток изученных к настоящему времени турбеллярий: обычно такие ядра имеют простую округлую форму. Распределение

ядерного гетерохроматина в необластах *G. wagini* не вполне отвечает модели «шахматной доски», характерной для необластов планарий (Tricladida, Plathelminthes) (Morita et al. 1969; Coward 1974; Hori 1982) и необластам первой стадии у макростомид *Macrostomum hystricinum marinum* Rieger, 1977, *Macrostomum lignano* Ladurner et al., 2005 (Macrostomida, Plathelminthes) и бескишечной турбеллярии *Convolutriloba longifissura* Bartolomaeus et Balzer, 1997 (Acoela, Acoelomorpha) (Rieger et al. 1999; Gschwentner et al. 2001; Bode et al. 2006).[1] По состоянию гетерохроматина и отдельным цитоплазматическим признакам необласты 1-го и 2-го типов *G. wagini* в какой-то мере сравнимы со стадиями 3 и 2 у макростомид (Rieger et al. 1999; Bode et al. 2006) и регенеративными клетками или стадией 3 у бескишечных турбеллярий (Hori et al. 1999; Gschwentner et al. 2001). При этом необласты 3-го типа *G. wagini*, по-видимому, не имеют прямых аналогов среди турбеллярий, упомянутых выше, поскольку крупные, очень плотные, причудливой формы гетерохроматиновые сгустки в ядре наблюдаются в клетках без каких-бы то ни было признаков цитоплазматической дифференциации. Между тем, согласно литературным источникам, более выраженной гетерохроматинизации ядра, как правило, сопутствует появление новых цитоплазматических органелл в дополнение к рибосомам и митохондриям. Так, у макростомид *M. hystricinum marinum*, *M. lignano* и бескишечной турбеллярии *C. longifissura* в необластах 3-й стадии (с массивными гетерохроматиновыми блоками и тяжами, а также с участками пристеночного конденсированного хроматина в ядре) цитоплазма содержит ШЕР и, в ряде случаев, комплекс Гольджи (Rieger et al. 1999; Gschwentner et al. 2001; Bode et al. 2006).

Присутствие аппарата Гольджи с секреторными гранулами и крупных рыхлых телец в необластах 1-го типа, очевидно, отражает начало дифференциации, несмотря на то обстоятельство, что при этом в ядре совсем не развит пристеночный хроматин. Похожие данные относительно раннего развития сложных синтетических органелл известны для необластов на стадии 2 у *M. lignano* (Macrostomida, Plathelminthes), в цитоплазме которых встречаются слабо развитый ШЕР и маленькие липидные капли (Bode et al. 2006). Также в необластах *Catenula* sp. (Catenulida, Plathelminthes) отмечают цистерны ШЕР и, изредка, аппарата Гольджи, наряду с кластерами центриолей (Moraczewski 1977).

Судя по морфологии и локализации клеток с признаками митотической активности, у *G. wagini* пролиферативными свойствами обладают как явно коммитированные необласты типа 1 (Рис. 3), так и необласты типов 2 и (или) 3 (Рис. 9, 10). На митотическую активность клеток и 2-го, и 3-го типов в какой-то мере намекает тот факт, что они иногда встречаются однотипными парами (Рис. 5, 8). При этом кажется вероятным, что какая-то часть необластов 2-го типа, с более выраженным ядерным гетерохроматином и структурами в виде гранул или рыхлых телец в цитоплазме, соответствует ранней стадии дифференциации и в делении уже не участвует. Отсутствие в цитоплазме одиночных митотических клеток особых структур и иных органелл, кроме митохондрий и рибосом, подтверждает это высказывание. С другой стороны, необласты 2-го и 3-го типов могли бы отождествляться с состоянием клетки в разных фазах единого клеточного цикла и представлять собой «стадии» этого цикла (а не «типы») в однородной популяции стволовых клеток. В свою очередь, мелкие необласты 3-го типа с характерными сгустками конденсированного гетерохроматина своей морфологией наводят на мысль о том, что они находятся в G_0. Возможно, необласты 3-го типа относятся к субпопуляции покоящихся или медленно циклирующих стволовых клеток, как это, в частности, предполагается для необластов В-типа с богатым гетерохроматином ядром у планарии *Dugesia japonica* Ichikawa et Kawakatsu, 1964 (Higuchi et al. 2007).

Склонность необластов 1-го типа к образованию небольших тесных скоплений, а также признаки явной специализации (в виде крупных рыхлых телец и аппарата Гольджи с секреторными гранулами, наряду с увеличенным объемом цитоплазмы) позволяют считать, что они представляют собой первичные половые клетки пока неясной ориентации (germline cells). В то же время хаотично разбросанные по всей паренхиме необласты 2-го и 3-го типов, вероятно,

---

[1] Модель «шахматной доски» предполагает однородное распределение маленьких, приблизительно одноразмерных сгустков гетерохроматина, не связанных между собой, по плоскости среза ядра (Rieger et al. 1999).

относятся к категории соматических стволовых клеток взрослых червей (adult somatic stem cells). Действительно ли последние типы являются субпопуляциями, или это лишь стадии в клеточном цикле однородной массы стволовых клеток паренхимы – для ответа на этот вопрос необходима проверка новыми методами.

Такие исследования ультраструктурной организации необластов с привлечением метода сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS) и последующего облучения полученных фракций рентгеновскими лучами были проведены на примере планарии *D. japonica* (Hayashi et al. 2006; Hayashi and Agata 2012; Higuchi et al. 2007; Shibata et al. 2010). Новые подходы позволили установить два определенных типа стволовых клеток (А и В) и один дополнительный – неклассифицируемый тип по терминологии авторов (Higuchi et al. 2007). Более крупные необласты А типа имеют ядра, богатые эухроматином и большое число хроматоидных телец; у необластов В типа в ядре сильнее развит гетерохроматин и меньше хроматоидных телец; в необластах неклассифицируемого типа хроматоидные тельца не обнаружены. При этом пролиферативными свойствами обладают не только собственно стволовые клетки перечисленных типов, но и дифференцирующиеся клетки (Higuchi et al. 2007). Последние характеризуются всеми признаками «классических» необластов, но имеют в цитоплазме слабо развитый ШЕР. Участие коммитированных необластов в митотическом цикле вместе с разными типами стволовых клеток позволило авторам высказать предположение о возможном разделении стволовых клеток в паренхиме у планарий на отдельные субпопуляции, как это имеет место у высших животных (Higuchi et al. 2007). Ранее на неоднородность популяции необластов у плоских червей (как паразитических, так и свободно живущих) указывали результаты светомикроскопических исследований по кинетике стволовых клеток (Дробышева [Drobysheva] 1983; Корнева [Korneva] 2007; Saló and Baguñà 1984; Drobysheva 1986; Palmberg 1990; Peter et al. 2004).

Убедительные доказательства в пользу неоднородности пролиферативного пула получены при использовании разнообразных молекулярных подходов. Гетерогенность стволовых клеток планарий подтверждается при анализе генной экспрессии в популяции необластов у *D. japonica* (Rossi et al. 2006; Rossi et al. 2008; Sato et al. 2006; Salvetti et al. 2009; Hayashi et al. 2010; Shibata et al. 2010; Shibata et al. 2012). Идентификация нескольких гомологов гена *piwi* и анализ экспрессии этих гомологов предполагают неоднородность популяции необластов у планарии *Dugesia ryukyuensis* Kawakatsu, 1976 (Nakagawa et al. 2012). Не связанная с клеточным циклом (т.е. с фазами S/G2/M) гетерогенность соматических стволовых клеток у планарии *Schmidtea mediterranea* выявляется при иммунном скрининге протеинов плазматической мембраны (Moritz et al. 2012). У *S. mediterranea* обнаружено существование, как минимум, двух раздельных субпопуляций стволовых клеток, и одна из них, как полагают авторы, состоит из некоммитированных, самовозобновляющихся необластов; при этом также подтверждается предположение о сохранении коммитированными необластами пролиферативных свойств (Moritz et al. 2012). Объединение РНК секвенирования (RNA-seq) необластов из раненых планарий *S. mediterranea* со скринингом экспрессии позволило отождествить 33 фактора транскрипции, транскрибируемых как в специфически дифференцированных клетках, так и в небольших фракциях необластов во время регенерации (Scimone et al. 2014).

Эти результаты наводят на мысль о том, что спецификация судьбы клеток для большинства (или всех) регенеративных линий имеет место среди необластов, которые происходят (наряду с регенеративными клетками бластемы) из весьма гетерогенного набора стволовых клеток с заданными направлениями дифференциации (Scimone et al. 2014).

Особое внимание заслуживают необычные для стволовых клеток турбеллярий кластеры разрозненных мелких гранул и не заключенные в мембрану рыхлые тельца изменчивых размеров и форм, обнаруженные в необластах *G. wagini* (Рис. 11). Существуют сомнения в том, что рыхлые тельца из разных клеток по сути своей идентичны: они различаются не только величиной и контурами, но и характером фиброзного материала, из которого состоят. Так, рыхлые тельца в необластах 2-го типа, как правило, сформированы тесно прилегающими друг к другу большими фиброзными гранулами (Рис. 11E, F). Участие подобных гранул в организации крупных рыхлых телец не столь очевидно, хотя в цитоплазме необластов 1-го типа также периодически наблюдаются

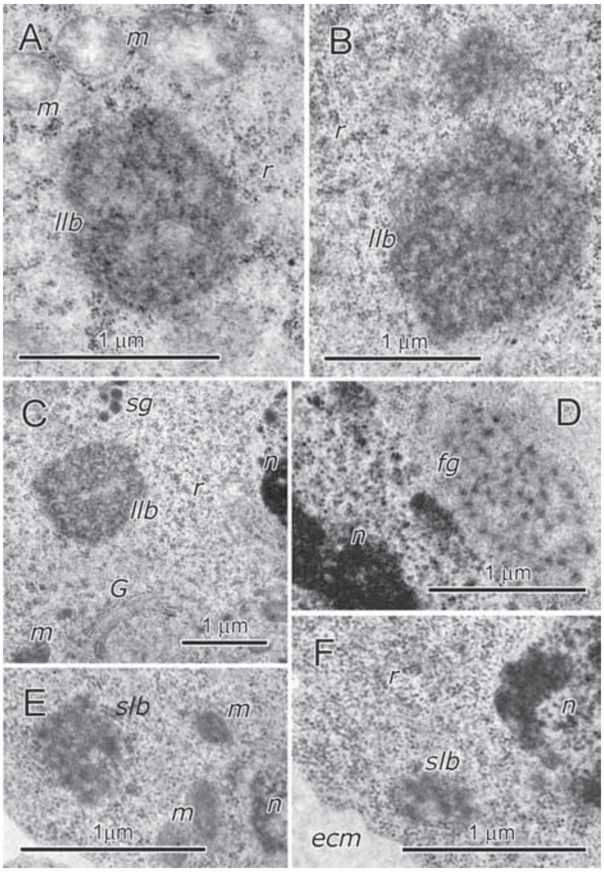


Рис. 11. *Geocentrophora wagini*. Рыхлые фиброзные тельца в необластах первого (A, C) и второго (E, F) типов и кластер мелких фиброзных гранул в необласте первого типа (D). *Сокращения: fg* – кластер мелких фиброзных гранул, *G* – аппарат Гольджи, *llb* – крупное рыхлое тельце, *m* – митохондрия, *slb* – мелкое рыхлое тельце, *n* – ядро, r – рибосомы, *sg* – секреторные гранулы.

Fig. 11. *Geocentrophora wagini*. Loose fibrous bodies in type 1(A, C) and type 2 (E, F) neoblasts and a small cluster of fibrous granules in the type 1 neoblast (D). *Abbreviations: fg* – cluster of small fibrous granules, *G* – Golgi apparatus, *llb* – large loose body, *m* – mitochondrion, *slb* – small loose body, *n* – nucleus, r – ribosomes, *sg* – secretory granules.

(обычно вблизи мембраны ядра) мелкие рыхлые образования либо из небольшого числа плотно сближенных крупных фиброзных гранул, либо более однородные по структуре, наподобие облачка. Возможно, что разные состояния фиброзного материала отражают последовательные стадии развития рыхлых телец.

Среди исследованных на электронно-микроскопическом уровне взрослых турбеллярий особые цитоплазматические структуры – хроматоидные тельца – известны и подробно изучены только в необластах планарий (Morita et al. 1969; Coward 1974; Hay and Coward 1975; Hori 1982; Hori and Kishida 2003; Auladell et al. 1993). Эти своеобразные «маркеры» соматических стволовых клеток взрослых планарий пока не были достоверно найдены в необластах других плоских червей.[2] Согласно имеющимся описаниям, плотный материал, компонующий хроматоидные тельца и у планарий, и у других животных за пределами Plathelminthes, наилучшим образом характеризуется как фиброзно-гранулярный или тонко-филаментозный (Coward 1974; Hay and Coward 1975; Nagamori and Sassone-Corsi 2008). У *G. wagini* ультраструктура рыхлых телец и гранул из кластеров вполне соответствует этим определениям, однако рыхлые тельца *G. wagini* отличаются от хроматоидных телец планарий менее плотной, но сложной структурированностью фиброзного материала и разнообразием форм.

Молекулярный состав и свойства хроматоидных телец в необластах планарий интенсивно исследуются (Sato et al. 2006; Yoshida-Kashikawa et al. 2007; Solana et al. 2009; Fernandéz-Taboada et al. 2010; Shibata et al. 2010; Rouhana et al. 2012; Rouhana et al. 2014). Известно, что они являются комплексами рибонуклеопротеидов (РНП) (Hori 1982; Auladell et al. 1993; Yoshida-Kashikawa et al. 2007) и играют важную роль в посттранскрипционной регуляции генной экспрессии в стволовых клетках (Solana et al. 2009; Fernandéz-Taboada et al. 2010; Shibata et al. 2010; Rouhana et al. 2012; Rouhana et al. 2014). Получены данные о неоднородности этих структур по содержанию РНП, ответственных за судьбу необластов (Shibata et al. 2010). Есть все основания допустить, что кластеры гранул и рыхлые тельца в необластах *G. wagini* функционально сравнимы с хроматоидными тельцами планарий и играют важную роль как в сохранении недифференцированного состояния и поддержании пролиферативных способностей, так и при коммитировании клеточных линий.

[2]Хроматоидные тельца мельком отмечены в необластах катенулиды *Paracatenula galateia* Dirks et al., 2011 (Catenulida) при низком увеличении электронного микроскопа, без анализа их ультраструктурной организации (Dirks et al. 2012).

Вышеизложенные литературные данные свидетельствуют о заметной морфологической и молекулярной изменчивости стволовых клеток у плоских червей и ацеломорф. Сравнительное ультраструктурное исследование необластов *G. wagini* предлагает в итоге дополнительные аргументы, подтверждающие гетерогенность пролиферативного компартмента у турбеллярий с участием в митотическом цикле коммитированных необластов. По-видимому, полиморфизм необластов обусловлен как фазами клеточного цикла и ранними стадиями специализации, так и гетерогенностью всего пролиферативного пула, в котором отдельные субпопуляции характеризуются индивидуальным клеточным циклом. Ввиду очевидных общих признаков с системной организацией стволовых клеток у млекопитающих, новые представления о стратегии необластов, как полагают, могут иметь большое значение для экспериментальных исследований стволовых клеток в области медицины (Peter et al. 2004; Agata 2008; Sánchez Alvarado 2007; Shibata et al. 2010; Önal et al. 2012; Resch et al. 2012; Rink 2013; Scimone et al. 2014). Между тем, различия в тонком строении особых цитоплазматических органелл, связанных с недифференцированным состоянием клетки или ее «стволовостью» (stemness), позволяют предположить определенную морфологическую вариабельность этих структур при становлении многоклеточности и выделении клеточных линий у анцестральных форм Metazoa. Нельзя исключить, что наличие/отсутствие хроматоидных телец или гранул могло бы оцениваться с позиции апоморфного или плезиоморфного признака стволовой клетки в определенных группах беспозвоночных.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую признательность д.б.н. О.А. Тимошкину за предоставленную возможность участвовать в рейсах по оз. Байкал и помощь в сборе живого материала. Работа выполнена на базе ЦКП «Таксон» Зоологического института РАН (по плановой теме № 01201351194) и при финансовой поддержке грантов РФФИ № 13-04-02002а и № 16-04-00593 А.

ЛИТЕРАТУРА

Aboobaker A.A. 2011. Planarian stem cells: a simple paradigm for regeneration. *Trends in Cell Biology*, **21**(5): 304–11.

Agata K. 2008. Stem Cells in Planarian. In: T.C.G. Bosch (ed.). Stem Cells: From Hydra to Man. Chapter 4. Springer Netherlands, Heidelberg: 59–74.

Agata K. and Watanabe K. 1999. Molecular and cellular aspects of planarian regeneration. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, **10**: 377–383.

Almuedo-Castillo M., Crespo X., Seebeck F., Bartscherer K., Salò E. and Adell T. 2014. JNK Controls the Onset of Mitosis in Planarian Stem Cells and Triggers Apoptotic Cell Death Required for Regeneration and Remodeling. *PLoS Genetics*, **10**(6): e1004400. doi:10.1371/journal.pgen.1004400

Auladell C., Garcia-Valero J. and Baguñà J. 1993. Ultrastructural localization of RNA in the chromatoid bodies of undifferentiated cells (neoblasts) in planarians by the RNase–gold complex technique. *Journal of Morphology*, **216**(3): 319–326.

Baguñà J. 1998. Planarians. In: P. Ferretti and J. Géraudie (eds.). Cellular and Molecular Basis of Regeneration: From Invertebrates to Humans. J. Wiley and Sons, Chichester, New York etc.: 135–165.

Baguñà J. 2012. The planarian neoblast: the rambling history of its origin and some current black boxes. *The International Journal of Developmental Biology*, **56**: 19–37.

Baguñà J., Salò E. and Auladell C. 1989. Regeneration and pattern formation in planarians III. Evidence that neoblasts are totipotent stem cells and the source of blastema cells. *Development*, **107**: 77–86.

Bode A., Salvenmoser W., Nimeth K., Mahlknecht M., Adamski Z., Rieger R.M., Peter R. and Ladurner P. 2006. Immunogold-labeled S-phase neoblasts, total neoblast number, their distribution, and evidence for arrested neoblasts in *Macrostomum lignano* (Platyhelminthes, Rhabditophora). *Cell and Tissue Research*, **325**: 577–587.

Coward S.J. 1974. Chromatoid bodies in somatic cells of the planarian: Observations on their behavior during mitosis. *The Anatomical Record*, **180**(3): 533–545.

De Mulder K., Pfister D., Kuales G., Egger B., Salvenmoser W., Willems M., Steger J., Fauster K., Micura R., Borgonie G. and Ladurner P. 2009. Stem cells are differentially regulated during development, regeneration and homeostasis in flatworms. *Developmental Biology*, **334**(1): 198–212.

Dimmeler S. and Losordo D. 2011. Stem Cells Review Series: An Introduction. *Circulation Research*, **109**: 907–909.

Dirks U., Gruber-Vodicka H.R., Leisch N., Bulgheresi S., Egger B., Ladurner P. and Ott J.A. 2012. Bacterial symbiosis maintenance in the asexually reproducing and regenerating flatworm *Paracatenula galateia*. *PLoS ONE*, **7**(4): e34709. doi:10.1371/journal.pone.0034709

Drobysheva I.M. 1983. Autoradiographic study of the digestive parenchyma in *Convoluta convoluta* (Turbellaria, Acoela). *Tsitologiya*, **25**(11): 1270–1277. [In Russian].

Drobysheva I.M. 1986. Physiological regeneration of the digestive parenchyma in *Convoluta convoluta* and *Oxyposthia praedator* (Turbellaria, Acoela). *Hydrobiologia*, **132**: 189–193.

Drobysheva I.M. 2007. To the question about tissue arrangement of parenchyma of turbellaria: different types of parenchymal cells in *Geocentrophora wagini* (Lecithoepitheliata, Plathelminthes). *Uchyonye zapiski Kazanskogo gosudarstvennogo universiteta*, **149**(3): 132–137. [In Russian].

Drobysheva I.M. 2012. Peculiarities of the ultrastructure of stem cells in lecithoepitheliata turbellarian (Plathelminthes). Abstracts of the 24th Russian Conference on Electron Microscopy (29 May–1 June 2012, Chernogolovka). Russian Academy of Sciences, Chernogolovka: 411. [In Russian].

Drobysheva I.M. 2014. Stem cells in turbellarians: variability of ultrastructural features. Proceedings of the II International conference: Modern problems of biological evolution (11–14 March 2014, Moscow). State Darwin Museum, Moscow: 232–235. [In Russian].

Egger B., Steinke D., Tarui H., De Mulder K., Arendt D., Borgonie G., Funayama N., Gschwentner R., Hartenstein V., Hobmayer B., Hooge M., Hrouda M., Ishida S., Kobayashi C., Kuales G., Nishimura O., Pfister D., Rieger R., Salvenmoser W., Smith J., Technau U., Tyler S., Agata K., Salzburger W. and Ladurner P. 2009. To be or not to be a flatworm: The acoel controversy. *PLoS ONE*, **4**(5): e5502. doi:10.1371/journal.pone. 0005502

Ehlers U. 1985. Das Phylogenetische System der Plathelminthes. Gustav Fischer, Stuttgart, New York, 317 p.

Eisenhoffer G.T., Kang H. and Sánchez Alvarado A. 2008. Molecular analysis of stem cells and their descendants during cell turnover and regeneration in the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Cell Stem Cell*, **3**(3): 327–339.

Elliott S.A. and Sánchez Alvarado A. 2013. The history and enduring contributions of planarians to the study of animal regeneration. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, **2**(3): 301–326.

Fernandéz-Taboada E., Moritz S., Zeuschner D., Stehling M., Schöler H.R., Saló E. and Gentile L. 2010. *Development*, **137**: 1055–1065.

Fernández-Taboada E., Rodríguez-Esteban G., Saló E. and Abril J.F. 2011. A proteomics approach to decipher the molecular nature of planarian stem cells. *BMC Genomics*, **12**: 133.

Gentile L., Cebria F. and Bartscherer K. 2011. The planarian flatworm: an in vivo model for stem cell biology and nervous system regeneration. *Disease Models & Mechanisms*, **4**: 12–19.

González-Estévez C., Felix D.A., Smith M.D., Paps J., Morley S.J., James V., Sharp T.V. and Aboobaker A.A. 2012. SMG-1 and mTORC1 Act Antagonistically to Regulate Response to Injury and Growth in Planarians. *PLoS Genetics*, **8**(3): e1002619. doi:10.1371/journal.pgen.1002619

Grivennikov I.A. 2008. Embryonic stem cells and the problem of directed differentiation. *Uspekhi Biologicheskoi Khimii*, **48**: 181–220. [In Russian].

Gschwentner R., Ladurner P., Nimeth K., Rieger R. 2001. Stem cells in a basal bilaterian. S-phase and mitotic cells in *Convolutriloba longifissura* (Acoela, Platyhelminthes). *Cell and Tissue Research*, **304**: 401–408.

Gustafsson M.K.S. 1977. Aspects of the Cytology and Histogenesis in Cestodes with Special Reference to the Genus *Diphyllobothrium*. PhD Thesis. Åbo akademi, Åbo, Finland, 73 p.

Hayashi T. and Agata K. 2012. A unique FACS method to isolate stem cells in planarian. *Methods in Molecular Biology*, **879**: 29–37.

Hayashi T., Asami M., Higuchi S., Shibata N. and Agata K. 2006. Isolation of planarian X-ray-sensitive stem cells by fluorescence-activated cell sorting. *Development Growth and Differentiation*, **48**: 371–380.

Hayashi T., Shibata N., Okumura R., Kudome T., Nishimura O., Tarui H. and Agata K. 2010. Single-cell gene profiling of planarian stem cells using fluorescent activated cell sorting and its "index sorting" function for stem cell research. *Development Growth and Differentiation*, **52**: 131–144.

Hay E.D. and Coward S.J. 1975. Fine structure studies on the planarian, *Dugesia*: I. Nature of the "neoblast" and other cell types in noninjured worms. *Journal of Ultrastructure Research*, **50**: 1–21.

Higuchi S., Hayashi T., Hori I., Shibata N., Sakamoto H. and Agata K. 2007. Characterization and categorization of fluorescence activated cell sorted planarian stem cells by ultrastructural analysis. *Development Growth and Differentiation*, **49**(7): 571–81.

Hori I. 1982. An ultrastructural study of the chromatoid body in planarian regenerative cells. *Journal of Electron Microscopy*, **31**(1): 63–72.

Hori I. 1992. Cytological approach to morphogenesis in the planarian blastema. I. Cell behavior during blastema formation. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, **24**(1): 75–84.

Hori I. 1997. Cytological approach to morphogenesis in the planarian blastema. II. The effect of neuropeptides. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, **29**(1): 91–97.

Hori I., Hikosaka-Katayama T. and Kishida Y. 1999. Cytological approach to morphogenesis in the planarian blastema. III. Ultrastructure and regeneration of the acoel turbellarian *Convoluta naikaiensis*. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, **31**(2): 247–258.

Hori I. and Kishida Y. 2003. Quantitative changes in nuclear pores and chromatoid bodies induced by neuropeptides during cell differentiation in the planarian

Dugesia japonica. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, **35**(4): 439–44.

Korneva Zh.V. 2007. Tissue plasticity and morphogeneses in cestodes. Nauka, Moscow, 187 p. [In Russian].

Ladurner P., Rieger R. and Baguñà J. 2000. Spatial distribution and differentiation potential of stem cells in hatchlings and adults in the marine platyhelminth *Macrostomum* sp.: A bromodeoxyuridine analysis. *Developmental Biology*, **226**(2): 231–241. doi:10.1006/dbio.2000.9867

Markosova T.G. and Mamkaev Yu.V. 2000. Morphofunctional investigation of the peripheral parenchyma in *Oxyposthia praedator* (Acoela). *Tsitologiya*, **42**(8): 740–749. [In Russian].

Moraczewski J. 1977. Asexual reproduction and regeneration of *Catenula* (Turbellaria, Archoophora). *Zoomorphologie*, **88**: 65–80.

Morita M., Best J.B. and Noel J. 1969. Electron microscopic studies of planarian regeneration. I. Fine structure of neoblasts in *Dugesia dorotocephala*. *Journal of Ultrastructure Research*, **27**: 7–23.

Moritz S., Stöckle F., Ortmeier C., Schmitz H, Rodríguez-Esteban G., Key G. and Gentile L. 2012. Heterogeneity of planarian stem cells in the S/G2/M phase. *The International Journal of Developmental Biology*, **56:** 117–125.

Nagamori I. and Sassone-Corsi P. 2008. Spotlight on Germ Cells. The chromatoid body of male germ cells: Epigenetic control and miRNA pathway. *Cell Cycle*, **7**(22): 3503–3508.

Nakagawa H., Ishizu H., Hasegawa R., Kobayashi K. and Matsumoto M. 2012. *Drpiwi-1* is essential for germline cell formation during sexualization of the planarian *Dugesia ryukyuensis*. *Developmental Biology*, **361**: 167–176.

Newmark P.A., Wang Y. and Chong T. 2008. Germ cell specification and regeneration in planarians. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **73**: 573–581.

Önal P., Grün D., Adamidi C., Rybak A., Solana J., Mastrobuoni G., Wang Y., Rahn H.-P., Chen W., Kempa S., Ziebold U. and Rajewsky N. 2012. Gene expression of pluripotency determinants is conserved between mammalian and planarian stem cells. *The EMBO Journal*, **31**(12): 2755–2769.

Palmberg I. 1986. Cell migration and differentiation during wound healing and regeneration in *Microstomum lineare* (Turbellaria). *Hydrobiologia*, **132**: 181–188.

Palmberg I. 1990. Stem cells in microturbellarians. An autoradiographic and immunocytochemical study. *Protoplasma*, **158**: 109–120.

Palmberg I. 1991. Differentiation during asexual reproduction and regeneration in a microturbellarian. *Hydrobiologia*, **227**: 1–10.

Pedersen K. J. 1959. Cytological studies on the planarian neoblast. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*, **50**: 799–817.

Peter R., Gschwentner R., Schürmann W., Rieger R.M. and Ladurner P. 2004. The significance of stem cells in free-living flatworms: one common source for all cells in the adult. *Journal of Applied Biomedicine*, **2**: 21–35.

Pfister D., De Mulder K., Hartenstein V., Kuales G., Borgonie G., Marx F., Morris J. and Ladurner P. 2008. Flatworm stem cells and the germ line: Developmental and evolutionary implications of macvasa expression in *Macrostomum lignano,* **319**: 146–159.

Reddien P.W. 2013. Specialized progenitors and regeneration. *Development*, **140**: 951–957.

Reddien P.W. and Sánchez Alvarado A. 2004. Fundamentals of planarian regeneration. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **20**: 725–757.

Resch A.M., Palakodeti D., Lu Y.-C., Horowitz M. and Graveley B.R. 2012. Transcriptome Analysis Reveals Strain-Specific and Conserved Stemness Genes in *Schmidtea mediterranea*. *PLoS ONE*, **7**(4): e34447. doi:10.1371/journal.pone.0034447

Rieger R.M., Legniti A., Ladurner P., Reiter D., Asch E., Salvenmoser W., Schürmann W. and Peter R. 1999. Ultrastructure of neoblasts in microturbellaria: significance for understanding stem cells in free-living Platyhelminthes. *Invertebrate Reproduction and Development*, **35**(2): 127–140.

Rieger R.M., Tyler S., Smith J.P.S. III and Rieger G.E. 1991. Platyhelminthes: Turbellaria. In: F.M. Harrison & B.J. Bogitsh (Eds.). Microscopic anatomy of invertebrates. V. 3, Platyhelminthes and Nemertinea. Wiley-Liss, New York: 7–140.

Rink J.C. 2013. Stem cell systems and regeneration in planaria. *Development Genes and Evolution*, **223**(1–2): 67–84.

Robb S.M.C., Ross E. and Sánchez Alvarado A. 2008. SmedGD: the *Schmidtea mediterranea* genome database. *Nucleic Acids Research*, **36**: D599–D606. doi:10.1093/nar/Gkm684

Robb S.M.C. and Sánchez Alvarado A. 2014. Chapter three – histone modifications and regeneration in the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Current Topics in Developmental Biology*, **108**: 71–93.

Rossi L., Salvetti A., Batistoni R., Deri P. and Gremigni V. 2008. Molecular and cellular basis of regeneration and tissue repair: planarians, a tale of stem cells**.** *Cellular and Molecular Life Sciences*, **65**(1): 16–23.

Rossi L., Salvetti A., Lena A., Batistoni R., Deri P., Pugliesi C., Loreti E. and Gremigni V. 2006. *DjPiwi-1*, a member of the *PAZ-Piwi* gene family, defines a subpopulation of planarian stem cells. *Development Genes and Evolution*, **216**(6): 335–346.

Rossi L., Salvetti A., Marincola F.M., Lena A., Deri P., Mannini L., Batistoni R., Wang E. and Gremigni V. 2007. Deciphering the molecular machinery of stem cells: a look at the neoblast gene expression profile. *Genome Biology*, **8**(4): R62. doi:10.1186/gb-2007-8-4-r62

Rouhana L., Vieira A.P., Roberts-Galbraith R.H. and Newmark P.A., 2012. PRMT5 and the role of symmetrical dimethylarginine in chromatoid bodies of planarian stem cells. *Development*, **139**: 1083–1094.

Rouhana L., Weiss J.A., Forsthoefel D.J., Lee H., King R.S., Inoue T., Shibata N., Agata K. and Newmark P.A. 2013. RNA interference by feeding *in vitro* synthesized doublestranded RNA to planarians: methodology and dynamics. *Developmental Dynamics*, **242**(6): 718–730.

Rouhana L., Weiss J.A., King R.S. and Newmark P.A. 2014. PIWI homologs mediate Histone H4 mRNA localization to planarian chromatoid bodies. *Development*, **141**(13): 2592–2601.

Saló E. 2006. The power of regeneration and the stem-cell kingdom: freshwater planarians (Platyhelminthes). *Bioessays*, **28**(5): 546–559.

Saló E., Abril J.F., Adell T., Cebrià F., Eckelt K., Fernandez-Taboada E., Handberg-Thorsager M., Iglesias M., Molina M.D. and Rodríguez-Esteban G. 2009. Planarian regeneration: achievements and future directions after 20 years of research. *The International Journal of Developmental Biology*, **53**(8–10): 1317–1327.

Saló E. and Baguñà J. 1984. Regeneration and pattern formation in planarians. I. The pattern of mitosis in anterior and posterior regeneration in *Dugesia (G) tigrina,* and a new proposal for blastema formation. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, **83**: 63–80.

Salvetti A., Rossi L., Bonuccelli L., Lena A., Pugliesi C., Rainaldi G., Evangelista M. and Gremigni V. 2009. Adult stem cell plasticity: Neoblast repopulation in non-lethally irradiated planarians. *Developmental Biology*, **328**: 305–314.

Sánchez Alvarado A. 2006. Planarian regeneration: Its end is its beginning. *Cell*, **124**: 241–245.

Sánchez Alvarado A. 2007. Stem cells and the Planarian *Schmidtea mediterranea*. *C. R. Biologies*, **330**: 498–503.

Sasidharan V., Lu Y.-Ch., Bansal D., Dasari P., Poduval D., Seshasayee A., Resch A.M., Graveley B.R. and Palakodeti D. 2013. Identification of neoblast- and regeneration-specific miRNAs in the planarian *Schmidtea mediterranea*. *RNA*, **19**(10): 1394–1404.

Sato K., Shibata N., Orii H., Amikura R., Sakurai T., Agata K., Kobayashi S. and Watanabe K. 2006. Identification and origin of the germline stem cells as revealed by the expression of *nanos*-related gene in planarians. *Development, Growth & Differentiation*, **48**(9): 615–28.

Scimone M.L., Kravarik K.M., Lapan S.W. and Reddien P.W. 2014. Neoblast specialization in regeneration of the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Stem Cell Reports*, **3**(2): 339–52.

Shibata N., Hayashi T., Fukumura R., Fujii J., Kudome-Takamatsu T., Nishimura O., Sano S., Son F., Suzuki N., Araki R., Abe M. and Agata K. 2012. Comprehensive gene expression analyses in pluripotent stem cells of a planarian, *Dugesia japonica*. *The International Journal of Developmental Biology*, **56**: 93–102.

Shibata N., Rouhana L. and Agata K. 2010. Cellular and molecular dissection of pluripotent adult somatic stem cells in planarians. *Development Growth & Differentiation*, **52**: 27–41.

Solana J., Lasko P. and Romero R. 2009. Spoltud-1 is a chromatoid body component required for planarian long-term stem cell self-renewal. *Developmental Biology*, **328**(2): 410–421.

Solana J., Kao D., Mihaylova Y., Jaber-Hijazi F., Malla S., Wilson R. and Aboobaker A. 2012. Defining the molecular profile of planarian pluripotent stem cells using a combinatorial RNA-seq, RNA interference and irradiation approach. *Genome Biology*, **13**: R19.

Tasaki J., Shibata N., Nishimura O., Itomi K., Tabata Y., Son F., Suzuki N., Araki R., Abe M., Agata K. and Umesono Y. 2011. ERK signaling controls blastema cell differentiation during planarian regeneration. *Development*, **138**(12): 2417–2427.

Vásquez-Doorman C. and Petersen C.P. 2014. *zic-1* Expression in Planarian Neoblasts after injury controls anterior pole regeneration. *PLoS Genetics*, **10**(7): e1004452. doi:10.1371/journal.pgen.1004452

Wagner D.E., Wang I.E. and Reddien P.W. 2011. Clonogenic neoblasts are pluripotent adult stem cells that underlie planarian regeneration. *Science*, **332(**6031): 811–816.

Wagner D.E., Ho J.J. and Reddien P.W. 2012. Genetic regulators of a pluripotent adult stem cell system in planarians identified by RNAi and clonal analysis. *Cell Stem Cell*, **10**(3): 299–311.

Weissman I.L. 2000. Stem cells: Units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*, **100**: 157–168.

Yoshida-Kashikawa M., Shibata N., Takechi K. and Agata K. 2007. DjCBC-1, a conserved DEAD box RNA helicase of the RCK/p54/Me31B family, is a component of RNA-protein complexes in planarian stem cells and neurons. *Developmental Dynamics*, **236(**12): 3436–3450.

Представлена 14 июля 2015; принята 4 марта 2016.